



Laboratorium Ziekenhuisapothek Gelderse
Vallei Bennekom.

P. de Waard, A. de Jong en J.J.W. Ros.

EEN ALTERNATIEVE EXTRACTIEMETHODE VOOR ANTIDEPRESSIVA

Inleiding:

Naar aanleiding van de recente discussie rondom de kwantificering van antidepressiva in serum, beschrijven wij kort onze ervaringen in de hoop hiermee een relevante bijdrage aan de discussie te leveren.

De twee belangrijkste aandachtspunten van de bepaling zijn enerzijds de extractie uit serum en anderzijds de kwantificering via HPLC.

Onze ervaring leert dat het verkrijgen van een schoon extract de meeste problemen oplevert. Wij hebben de extractiemethoden zoals die in Extract zijn beschreven alle nagewerkt, maar concluderen dat deze methoden òf te bewerkelijk zijn òf een extract geven dat niet schoon genoeg is.

Werkwijze:

De volgende extractiemethoden zijn onderzocht:

- Enkelvoudige extractie met dichloormethaan, hexaan/isoamylalcohol 99/1 of heptaan/isoamylalcohol 99/1. De extractievloeistof wordt drooggedampt en het residu wordt opgenomen in eluens (1, 2).
- Drievoudige extractie met heptaan/isoamylalcohol:99/1 en zoutzuur 0.1 M. De organische fase wordt teruggeëxtraheerd met zoutzuur 0.1 M. Aan het zuur wordt een buffer, pH=11 toegevoegd en vervolgens wordt er opnieuw geëxtraheerd met heptaan/isoamylalcohol. De laatste fase wordt drooggedampt en het residu wordt opgenomen in eluens (2).
- Tweevoudige extractie met heptaan/isoamylalcohol 99/1, hexaan/isoamylalcohol 99/1, heptaan of hexaan. De organische fase wordt teruggeëxtraheerd met eluens (pH=3.0)(methode

Gelderse Vallei).

Resultaten:

Met zowel de enkel- als de drievoudige extractiemethoden zijn bij ons geen goede resultaten te verkrijgen. De belangrijkste nadelen zijn stoorpieken in het chromatogram van blanco-kalfsserum of een minder goed extractierendement. Bovendien is de drievoudige extractie bewerkelijk.

Onze tweevoudige extractiemethode blijkt goed te voldoen. Hierbij levert heptaan betere resultaten dan hexaan. Het weglaten van isoamylalcohol is niet nadelig voor het extractierendement en geeft een mooier chromatogram met een minder grote injectiepiek.

Er is ook gekeken naar het effect van methanol-toevoeging aan het serum (1) en het gebruik van diverse buffers (1,2). De methanol-toevoeging geeft geen betere resultaten, dus lijkt ons overbodig. Na_2CO_3 1M geeft een hoger extractierendement dan NaOH 4M en boraatbuffer pH=9.3 en heeft onze voorkeur.

Ons blanco-kalfsserum chromatogram bevat geen stoorpieken en de extractierendementen van de antidepressiva komen overeen met die van Tilburg (1).

Methode Gelderse Vallei:

Bovenstaande bevindingen hebben geresulteerd in de volgende werkwijze:

Reagentia :

Heptaan

Buffer pH=11,0. Los op 14.3 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in water en vul aan tot 50.0 ml.

Interne standaard : Fluvoxamine, 100 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ water.

Pipetteer 100 μl interne standaard + 100 μl buffer + 1,0 ml serum in een rondbodemuis.

Voeg toe 5 ml heptaan en vortex 1 minuut.

Centrifugeer 5 minuten bij 3200 rpm.

Breng de heptaanlaag over in een schone puntbuis.

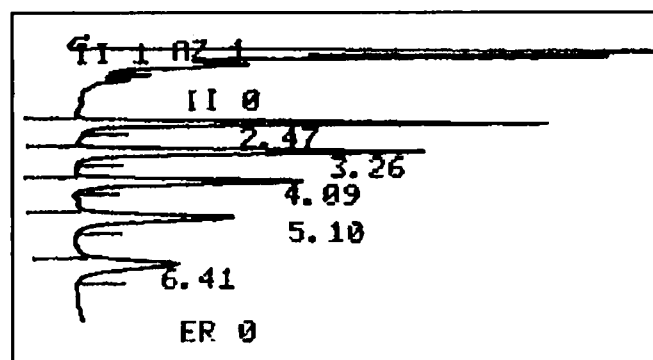
Voeg 200 μl eluens (zie hieronder) toe en vortex 1 minuut.

Centrifugeer opnieuw en verwijder het grootste deel van de heptaanlaag.

Zuig m.b.v. een injectiespuit ca. 100 μl van het eluens op en breng over in een monsterflesje met conische inlage.

Injecteer 40 μl in de HPLC (Spectra-physics HPLC, golflengte 254 nm, flow 1.0 ml/min. Kolom: Chromspher B (3). Eluens: 1.50 g KH_2PO_4 in 550 ml water (= 20 mM) + ca. 4 druppels geconcentreerd H_3PO_4 tot pH=3.0 + 450 ml acetonitril). Een voorbeeldchromatogram van KKGT-referentieserum ADII is bijgevoegd.

VOORBEELD CHROMATOGRAM VAN KKGT-REFERENTIESERUM ADII, 1993:



1. Fluvoxamine (interne standaard), 2.47 min.
2. Desipramine, 3.26 min.
3. Imipramine, 4.09 min.
4. Desmethylclomipramine, 5.10 min.
5. Clomipramine, 6.41 min.

Conclusie:

De door ons ontwikkelde extractiemethode blijkt eenvoudig, snel en betrouwbaar en heeft tevens het voordeel dat er geen dichloormethaan gebruikt hoeft te worden.

Literatuur:

1. R. Kaletzky en R. Langen, Tricyclische antidepressiva voor een depressieve analist, Extract 1992, nr 3.
2. P. Bouma, B. Greijdanus, H. Bloemhof en D.R.A. Uges, Tricyclische antidepressiva discussie, Extract 1993, nr 4.
3. Chrompack, Chromspher B, Analysis of basic compounds, nr 503553.